



Double-Luciferase Reporter Assay Kit

Catalog#JKR23008-100T

Instruction Manual

Sufficient reagents for 100T Double-Luciferase Reporter Assay per kit.
Store at -20°C

目录

1. 保存	02
2. 产品说明	02
3. 试剂盒组成	02
4. 操作步骤	03
5. 注意事项	05
6. 附录	05



1. 保存

试剂盒于-20°C保存。Cell Lysis Buffer -20°C保存一年，配制好的荧光素酶反应试剂 (Luciferase Reaction Reagent和Luciferase Reaction Reagent II)需分装后避光保存，-70°C可保存一年，-20°C可保存一个月。

2. 产品说明

萤火虫荧光素酶(firefly luciferase)和海肾荧光素酶(Renilla luciferase)可分别催化荧光素 (luciferin)或腔肠素 (coelenterazine)氧化形成oxyluciferin或coelenteramide,并在此过程中产生生物荧光。Double-Luciferase Reporter Assay Kit首先以荧光素为底物检测萤火虫荧光素酶报告基因的活性,之后在淬灭该荧光反应的同时,以腔肠素为底物检测海肾荧光素酶报告基因的活性,具有检测迅速、灵敏度高、检测范围广、无细胞内源活性干扰等特点。

3. 试剂盒组成

Component	JKR23008 (100 rxns)	保存温度
Luciferase Reaction Buffer	50 mL	-20°C
Luciferase Reaction Substrate (50X)	200 µL	-20°C
Luciferase Reaction Buffer II	10 mL	-20°C
Luciferase Reaction Substrate II (50X)	200 µL	-20°C
Cell Lysis Buffer 1X	10 mL	-20°C

4. 操作步骤

自备

Product Name
PBS(1X): 配方见附录
小钢珠或研钵、研磨杵

4.1 试剂配制

将Luciferase Reaction Buffer与Luciferase Reaction Buffer II从-20°C取出,恢复至室温,保证各组分完全溶解。(注意: Luciferase Reaction Buffer II如出现沉淀属正常现象,可以37°C水浴20min左右,充分震荡溶解后即可使用。)

4.1.1 Luciferase Reaction Reagent

按1: 49的比例将Luciferase Reaction Substrate同Luciferase Reaction Buffer混合,于30min内检测裂解物(最好现配现用),剩余试剂建议-20°C或-70°C避光保存。

4.1.2 Luciferase Reaction Reagent II

按1:49的比例将Luciferase Reaction Substrate II同Luciferase Reaction Buffer II混合,于30min内检测裂解物(最好现配现用),剩余试剂建议-20°C或-70°C避光保存。

4.2 样品处理

a. 动物细胞

- 1) 贴壁细胞: 去除细胞培养基,用1XPBS小心润洗两次,加入适量1XCell Lysis Buffer,室温充分裂解10分钟后,刮取细胞于1.5 mL离心管中。
- 2) 悬浮细胞: 收集细胞,300xg离心5分钟,去除培养基。加入适量1XCell Lysis Buffer,吹打混匀,室温充分裂解10分钟。

Cell Culture Plate	Lysis Buffer/Well
6-well	500 μ L
12-well	300 μ L
24-well	150 μ L
48-well	60 μ L
96-well	20 μ L

裂解完成后, 2-8°C, 12,000xg离心10分钟, 取上清待检测。

b. 植物叶片(以烟草叶片为例)

- 1) 取3-4片直径为6-8 mm的烟草叶片放入2 mL的EP管中, 同时加入预冷的3-4个小钢珠, 并加入适量的液氮, 使用破碎仪进行研磨破碎; 或取3-4片直径为6-8 mm的烟草叶片放入研钵中, 加入适量液氮, 用研磨杵研磨破碎。
- 2) 破碎完成后, 成粉末状, 加入300 μ L 1XCell Lysis Buffer(1个叶片对应100 μ L裂解液)。吹打混匀, 室温充分裂解5分钟。
- 3) 2-8°C, 12,000xg离心2分钟, 取上清待检测。

c. 原生质体

- 1) 收集原生质体, 计数, 300xg离心5分钟, 去除上清。
- 2) 按照 10^5 原生质体/100 μ L 1XCell Lysis Buffer加入裂解液, 吹打混匀, 室温充分裂解10分钟。
- 3) 2-8°C, 12,000xg离心2分钟, 取上清待检测。

4.3 荧光检测

吸取10~20 μ L裂解物至不透明96孔板中, 将100 μ L平衡至室温的Luciferase Reaction

Reagent加入板中,水平震荡混匀,于化学发光仪(luminometer)中检测萤火虫荧光素酶报告基因的活性(如果读值封顶建议降低裂解物体积)。之后吸取100 μ L平衡至室温的Luciferase Reaction Reagent II加入上述反应管或板中,水平震荡混匀,于化学发光仪中检测海肾荧光素酶报告基因的活性。结果计算:萤火虫荧光读值/海肾荧光读值

5. 注意事项

- Luciferase Reaction Buffer II在溶解过程中可能有部分沉淀析出,使用前应充分需荡或将其置于37 $^{\circ}$ C水浴锅中,保证其完全溶解后再使用。
- Luciferase Reaction Reagent和Luciferase Reaction Reagent II反应前需平衡至室温。
- 为保证实验数据准确可靠,建议测量大量样品时使用排枪添加Luciferase Reaction Reagent和Luciferase Reaction Reagent II,使用过程中务必留意排枪各孔吸取的液体是否一致。
- Luciferase Reaction Reagent和Luciferase Reaction Reagent II均易发生氧化反应,请合理安排实验,避免样品解冻后在室温下长时间放置。

6. 附录

PBS配制方法:称取8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂ HPO₄和0.24g KH₂ PO₄,溶于800ml蒸馏水中,用HCl调节溶液的pH值至7.4,最后加蒸馏水定容至1L即可。在15lbf/in²(1034 \times 105Pa)高压下蒸气灭菌(至少20分钟),保存于室温或4 $^{\circ}$ C冰箱中。



武汉金开瑞生物工程有限公司

WUHAN GENE CREATE BIOLOGICAL ENGINEERING CO., LTD.

地址：武汉市东湖新技术开发区高新大道666号生物城创新园B4栋二楼

电话：027-87960366

邮箱：marketing@genecreate.com

网址：www.genecreate.cn

